动 物 学 研 究 2001, Dec. 22 (6): 497~501
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

综述

Timeless 与生物钟基因

刘仲敏 张亚平①
(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223)

摘要：综述了 *timeless* 基因的发现、多态性和重要功能。*timeless* 是最先被发现的两个生物钟基因之一。生物钟的昼夜节律由 PER、TIM、CLOCK 和 CYCLE 4 个生物钟齿轮组成的正负反馈回路进行调节。其中 TIM 可以受光因子调控，它还可以与 PER 形成异二聚体，通过正负调控方式调节果蝇的昼夜节律行为。

关键词：*Timeless* 基因；生物钟基因；分子机制
中图分类号：Q71，Q75 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2001)06-0497-05

从蓝细菌到人类几乎所有的生物体内的生理活动和外在行为都表现出其自身的节律（Dunlap *et al*., 1995; Hall, 1995）。这是一种近昼夜节律，受外界因素，尤其是光的调节。当无外界因素存在或一直处于黑暗的状态下，生物体内的各种活动仍然具有节律。由此可见，生物节律是由其内在的生物钟所控制的。这种节律系统包括输人机制、内在的生物钟和输出机制。三者彼此协调才能使生物的各种活动具有节律性。遗憾的是，人们对生物钟机制虽然有所了解，但对其他作用机制却知之甚少。而内在的生物钟机制，实际上是一些生物钟基因相互作用的结果。

自 1971 年 Konopka & Benzer 报道了果蝇昼夜节律突变型以来，已克隆了多个生物钟基因并测序，如 *period*(*per*)和 *timeless*(*tim*)等。果蝇 *per* 基因是第 1 个被克隆的生物钟基因，随后又分离出多个 *per* 基因的突变体(Hamblen *et al*.,1998)。但 *per* 基因究竟如何在生物节律中发挥作用，则知之不多(郑向忠等,1998)。直到果蝇的第 2 个被克隆的生物钟基因 *tim* 的出现，人们才对昼夜节律的分子机制有了较深人的了解。

与 *per* 基因相比，*tim* 基因的研究工作起步较晚。在发现 *per* 基因 10 年以后，才获得第 1 个 *tim* 基因的突变体(Sehgal *et al*.,1994)。目前已获得 10 个 *tim* 基因的突变体。通过对这些基因突变型和相关基因产物的分析鉴定，已经在 *tim* 基因的研究中取得了长足的进展。随着对其他的生物钟基因的相继发现，一种公认的生物钟分子调控机制——反馈调节回路(Hardin,1998)凸现出来。以往的研究表明，*tim* 基因在此反馈回路中发挥着重要作用(Sehgal *et al*.,1995)。总结 *tim* 基因的结构特点以及在昼夜节律行为分子机制中的重要作用，有助于深人研究其他高等动物乃至人类复杂的行为规律。

1 *tim* 基因的发现

通过 P 因子的转座作用，Sehgal *et al*.(1994)在果蝇中筛选出了影响生物节律的新突变体。它对生物节律的影响与 per^0 相似，即可以使果蝇的化蛹和活动节律异常。如果一直处于黑暗条件下，该突变体活动并不表现出节律，即不存在内在的生物钟。随后的研究发现，它定位于多线染色体中第 2 染色体的左臂上；进一步研究表明它位于 *dpp* 和 *dp* 2 个基因之间。并把这一突变体对应的野生型基因称为 *timeless* 基因。简写成 *tim*，它的突变体则用 tim^0 表示(Sehgal *et al*.,1994)。另一研究表明，在 *tim* 突变体中，PER 在核中的定位受到抑制(Vosshall *et*

收稿日期：2001-06-05；修改稿收到日期：2001-07-02
基金项目：国家自然科学基金和中国科学院知识创新工程资助项目
①通讯联系人，E-mail：zhangyp@pubic.km.yn.cn

al.,1994)。从而揭示 *tim* 基因与 *per* 基因间似乎存在某种微妙关系。之后,Myers *et al*.(1995)、Ousley *et al*.(1998)相继报道了 *D.rosophila melanogaster* 和 *D.virilis* 的 *tim* 基因的序列测定结果。

非常有趣的是,在 *D.melanogaster* 中发现2种类型的 *tim* 基因,分别为 *tim*1 和 *tim*2 (Benna *et al*.,2000)。最初获得的是 *tim*1,它的转录产物为 4 955 bp 的 mRNA。*tim*1 基因中,由于剪接方式不同,它可以编码2种蛋白,氨基酸数目分别为 1 122 和 1389个。这2种TIM蛋白的氨基酸残基从1～1 104 完全一致,只 C 末端不同。推测具有 1 389 个氨基酸的 TIM 蛋白可能发挥主要的功能。

进一步研究 *D.virilis* 中 *tim* 基因的内含子和外显子的结构组成后发现,它具有 11 个外显子和 10 个内含子,包括 1 343 个氨基酸的开放阅读框架,且 N 末端比 *D.melanogaster* 的 N 末端多 32 个氨基酸。后经实验证明,该 N 端序列在不同的物种间非常保守,且可能具有重要功能。通过反转录 PCR 实验推测,*D.melanogaster* 的 TIM1 蛋白(1 389 个氨基酸)似也应该包括这 32 个氨基酸,因此它的氨基酸残基的数目可能应为 1 421 个(Ousley *et al*.,1998)。

而 *D.melanogaster* 的 *tim*2 基因是近年来才筛选出来的。它的转录产物 mRNA 为 4.3 kb, 编码的氨基酸具有 1 348 个残基。所以 *tim*1 和 *tim*2 是果蝇中2种不同类型的 *tim* 基因, 这2种基因的 N 端序列比 C 端保守 (Benna *et al*., 2000)。

2 TIM 蛋白的结构域在物种间相对保守

比较 *D.melanogaster* 和 *D.virilis* 的 TIM 蛋白,发现两者的 TIM 具有较高的保守性,其氨基酸的相似度达到 76%。而两者已知的大部分结构域则具有更高的保守性,有 80%以上的序列一致。在 TIM 蛋白中,已发现的结构域包括 NLS 结构域、与 *per* 相互作用的结构域(PER－1 和 PER－2)、CLD 结构域和酸性结构域。NLS 序列在2种果蝇中除了1个氨基酸(Glu-Asp)有差别,其他均一致。PER－1 和 PER－2 在2种果蝇的保守程度,与 *per* 中与 TIM 相互作用的结构域,即 PAS 域在不同种间的保守性相似。PAS 域是许多蛋白家族所具有的共同特征,最初是在 PER、ARNT 和 SIM 3 种蛋白中发现的,且它是真菌、昆虫以及哺乳动物生物钟节律所必需的转录因子共有的特征(Dunlap,1999)。而 CLD 结构域和酸性结构域的情况则差别很大,它们都位于非保守区域。值得注意的是,N 末端区有一段额外的 32 个氨基酸的序列非常保守,其存在对于 tim^{01} 野生型的恢复至关重要。因而推测此区域可能具有尚未发现的重要功能(Ousley *et al*.,1998)。

3 *tim* 基因的多态性

从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)到哺乳动物均发现 *tim* 的同源基因存在,分别属于 *tim*1 和 *tim*2 两种不同类型。最初在 *D.melanogaster* 中获得的是 *tim*1 基因,且在哺乳动物中似乎也发现了其同源基因(Zylka *et al*.,1998;Sangoram *et al*.,1998)。但是哺乳动物中的 *tim* 基因对于哺乳动物生物钟的作用微乎其微(Kume *et al*.,1999)。尽管鼠科动物的 *tim* 基因(*mmTim*)对于其自身的发育是必不可少的,而 *tim* 基因突变对果蝇会导致节律丧失但并不致死(Gotter *et al*.,2000)。这种功能差异令许多学者怀疑已获得的哺乳动物的 *tim* 基因可能并不是果蝇 *tim*1 基因的真正同源基因。

鉴于 *tim* 基因在果蝇和哺乳动物中具有如此大的功能差异,人们又开始在果蝇中寻找可能存在的 *tim* 基因的新同源基因。利用反转录 PCR 又在果蝇中筛选出 *tim* 基因的另一种同源基因 *tim*2。对 TIM 蛋白家族的系统发生的分析结果表明,果蝇的 *tim*2 基因与哺乳动物的 *tim* 具有很大的同源性,所以哺乳动物的 *tim* 基因可能是此基因的同源物,而不是 *tim*1 基因的同源蛋白。已有研究表明,果蝇的 *tim*1 基因可能在节肢动物和线虫分化后,从其较原始的 *tim*2 基因演化而来,在其后来的进化过程中失去了原有的功能,而变成了昆虫生物钟调控回路中的一个重要成员。2种 *tim* 基因在序列上也具有很大的差异,它对应的编码蛋白差异也很大。分析结果表明,这2种 *tim* 基因只有 12%的氨基酸的序列一致,且已经发现 TIM 蛋白在长度上也呈现多态性(Benna *et al*.,2000;Rosato *et al*.,1997)。

迄今为止,在所有已经测定了 TIM 的氨基酸末端的果蝇中,除了部分 *D.melanogaster* 外,它们的翻译氨基酸的起始密码子位于最初报道的 *D.melanogaster* 的起始密码子的下游区,两者之间相差 68 bp,包括 *D.yakuba*、*D.virils* 等。而在2个起始密码子之间仅仅由于一个碱基的缺失与否,就可以导致产生或长或短的 TIM 蛋白。选择不同的密码子可以获得不同的 N 末端,这种特性可能在 PER 和 TIM 的调节过程中具有重要的作用(Rosato

et al.,1997)。Zordan et al.(未发表资料)的初步研究结果表明:TIM 蛋白的长度多态性是普遍存在的;有趣的是,它呈纬度梯度分布。即随着纬度的改变,TIM 蛋白的长度发生相应的变化。

4　*tim* 基因的重要功能

以往的研究结果表明，*tim* 基因在果蝇的生物节律中发挥着重要的调控作用，且 *tim* 对行为节律的作用可能与 *per* 基因的产物有关（Sehgal，1994)。而 *tim* 基因对生物多种活动节律具有协同进化关系（Piccin et al.，2000)。

果蝇、脉孢菌和老鼠的昼夜节律在进化过程中似乎是高度保守的,而且这种节律似乎受到与反馈回路相似的调控回路的控制(Wilsbacher & Takahashi, 1998; Dunlap, 1999; King & Takahashi, 2000; Wager-Smith & Key, 2000)。在果蝇中，*per*、*tim*、*dClk*、*dCyc*(果蝇 *dCyc* 是哺乳动物 *bmal*1 的同源基因)(Darlington et al., 1998; Rutila et al., 1998)和 *dbt* 5 个生物钟基因是维持其正常昼夜节律调控回路所必需的(Hardin et al.,1990; Sehgal et al.,1994; Myers et al., 1995; Gekakis et al., 1995; Allada et al., 1998; Darlington et al., 1998; Rutila et al., 1998; Price et al.,1998)。其中 *per*、*tim*、*dClk* 的 mRNA 与蛋白水平呈现昼夜周期波动现象。这种 mRNA 尤其是 *per*、*tim* mRNA 的周期波动是生物钟调节机制正常运行的基础(Hardin et al.,1990; Sehgal et al.,1994)。最近的实验证明,光可以影响 *per* 和 *tim* 基因产物的周期波动,并且光还可以影响 PER-TIM 的结合,从而导致 PER 和 TIM 相移(Lee et al., 1996; Myers et al.,1996)。最终使生物钟与外在的环境达到同步(Eskin,1979)。

此反馈环的具体作用方式如图1。TIM通过与

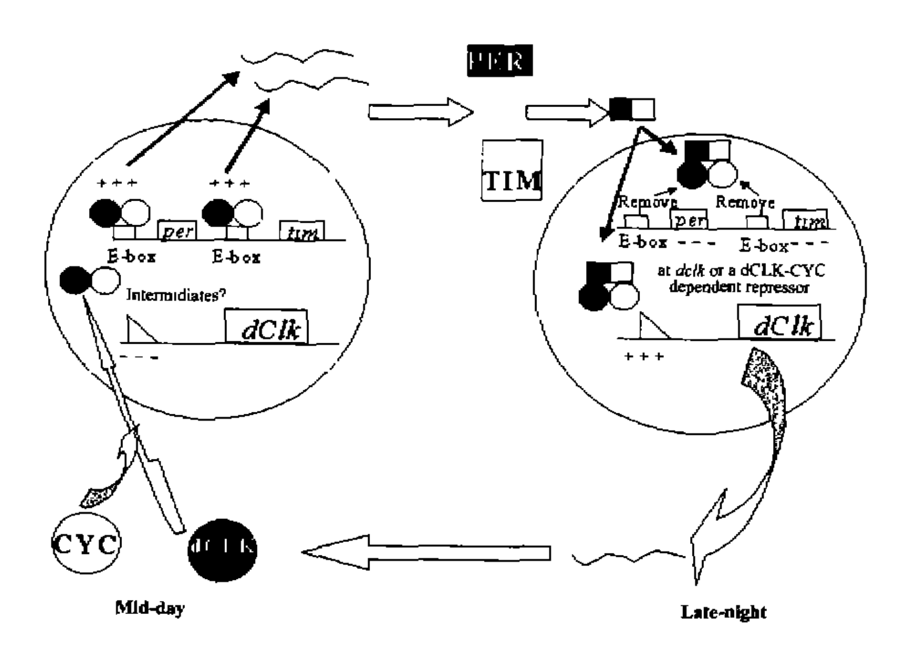


图 1　果蝇的生物钟的调节模式 [引自 Glossop (1999) 略作修改]

Fig.1　Model for gene regulation within the *Drosophila* biological clock (from Glossop, 1999)

PER 的异型结合,调节 PER 进入核的时间进而调节昼夜节律行为。但是两者都不具有 DNA 结合活力,因此,PER 可能通过其 PAS 域或之外的区域(Saez & Young,1996)与其他含有 bHLH-PAS 域的生物钟基因结合,来进行负反馈调节。最近发现,*per* 上游的增强子序列中的 1 个 E-box(enhancer box)是 *per* RNA 高水平表达所必需的(Hao et al.,1997; Darlington et al.,1998)。而 *tim* 的 E-box 的作用方式有所不同,它需和上游相邻的顺式作用因子结合在一起,进而促进 *tim* mRNA 的高水平表达(Darlington et al., 1998; Wang et al., 2001; McDonald et al., 2001);同时,E-box 还是 bHLH 异型二聚蛋白的结合部位。而在此机制中恰好有 2 个含有 bHLH-PAS 域的转录因子 CLOCK 和 CYCLE,两者之间通过它们

的PAS域相互作用,形成CLOCK-CYCLE异二聚体结合到 *per* 和 *tim* 的E-box增强子上,分别驱动 *per* 和 *tim* 的表达(Gekakis *et al*., 1998; Rutila *et al*., 1998)。随着PER和TIM的积累并进入核内,它们与dCLOCK-CYCLE相互作用导致异二聚体改变构象或者掩盖它的结构域,进而阻遏CLOCK-CYCLE与E-box的结合,消减了 *per* 和 *tim* 的转录;与此同时,通过一个独立的激活因子或激活因子复合物又可以促进 *dClk* 的转录。与之相对应,在缺少PER-TIM的情况下,高水平的dCLK-CYC可以激活 *per* 和 *tim* 的转录,同时抑制 *dClk* 的转录,其作用方式可能是直接或间接的,这样就形成了2个相互调节的反馈环,从而驱动果蝇生物节律内部生物钟的正常运转(Glossop *et al*., 1999)。这个生物钟再经过一些尚未知的调节蛋白质的稳定性及磷酸化的蛋白的放大作用,而使生物体具有节律性。此回路中的DBT(double-time基因的表达扬)影响PER的磷酸化过程,进而调节PER的稳定性,DBT很可能是PER翻译后的调节因子(Price *et al*., 1998)。

在光照情况下,TIM极不稳定。因而外界的光暗周期是TIM昼夜波动的驱动力(Myers *et al*., 1996)。各种生物通过光敏色素接受光信号(Barinaga, 1998),在光、光敏色素、DBT的驱动下,PER-TIM和dCLK-CYC处于动态变化过程,使得生物体与外界环境协调,表现出昼夜节律的特征。*tim* 基因既有正向也有负向调控的功能。所以,*tim* 基因在昼夜节律的分子调控机制中发挥着不可替代的作用。

5 小结与展望

总之,生物钟的昼夜节律由PER、TIM、CLOCK和CYCLE 4个生物钟齿轮组成的正负反馈回路进行调节。其中TIM可以受光因子调控,它还可以与PER形成异二聚体,通过正负调控方式调节果蝇的昼夜节律行为。但是这个内在的生物钟怎样与输入机制以及输出机制相协调,还有哪些因子参与了这2个过程,尚不得而知。

尽管对 *tim* 基因及生物节律的作用的研究过程较为漫长,但是将遗传学和基因组学相结合,对节律行为分子机制的研究已经取得了非凡的成就,尤其是在昼夜节律的分子生物学机制方面。近年来,已有越来越多的学者关注生物钟的研究,此外,人类基因组测序工作的完成又为该课题的进一步深入提供了方便。利用人类基因组提供的候选序列,可以在哺乳动物中发现更多的生物钟基因,再与后基因组的分析相结合,其研究结果将有助于对睡眠异常和精神疾病的治疗。此外,人类基因组的成果还将对生物节律的输出机制研究产生巨大的影响,结合DNA芯片技术我们可以进一步鉴定出控制哺乳动物输出机制相关的基因,最终加速昼夜节律的研究进程,从而在不同水平对人类复杂行为有一个全面深入地了解。

致 谢 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室吕雪梅、罗静、庞峻峰3位博士对本文提出很多有益的修改意见,在此深表感谢。

参 考 文 献

Allada R, While N, So W V *et al*, 1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*[J]. *Cell*, **93**: 791-804.

Barinaga M, 1998. Clock photoreception shared by plants and animals [J]. *Science*, **282**: 1628-1630.

Benna C, Scannapieco P, Piccin A *et al*, 2000. A second *timeless* gene in *Drosophila* shares greater sequence similarity with mammalian *tim* [J]. *Current Biology*, **10**(14): R512-513.

Darlington T K, Wager-Smith K, Ceriani M F *et al*, 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*[J]. *Science*, **280**: 1599-1602.

Dunlap J C, 1999. Molecular bases for circadian clocks[J]. *Cell*, **96**: 271-290.

Dunlap J C, Loros J J, Aronson B D *et al*, 1995. The genetic basis of the circadian clock: identification of *frq* and FRQ as clock components in *Neurospora*[J]. *Ciba Found. Symp*., **183**: 3-17.

Eskin A, 1979. Identification and physiology of circadian pacemakers[J]. *Fed. Proc*., **38**: 2570-2572.

Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown A *et al*, 1995. Isolation of *timeless* by PER protein interaction: Defective interaction between *timeless* protein and *long-period* mutant *PerL*[J]. *Science*, **270**: 811-815.

Gekakis N, Staknis D, Nguyen H B *et al*, 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism[J]. *Science*, **280**: 1564-1569.

Glossop N R, Lisa C L, Hardin P E, 1999. Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator[J]. *Science*, **286**: 766-768.

Gotter A L, Manganaro T, Weaver Dr *et al*, 2000. A *timeless* function for

mouse *Timeless*[J]. *Nat. Neurosci.*, 3(8): 755 - 756.

Hall J C, 1995. Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks[J]. *Trends Neurosci.*, 18: 230 - 240.

Hamblen M J, White N E, Emery P T J *et al*, 1998. Molecular and behavioural analysis of four *period* mutants in *Drosophila melanogaster* encompassing extreme short, novel long, and unorthodox arrhythmic types[J]. *Genetics*, 149: 165 - 178.

Hao H, Allen D L, Hardin P E, 1997. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila*[J]. *Mol. Cell Biol.*, 17(7): 3687 - 3693.

Hardin P E, Hall J C, Rosbash, 1990. Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its mRNA levels[J]. *Nature*, 343: 536 - 540.

Hardin P E, 1998. Activating inhibitors and inhibiting activators: a day in the life of a fly [J]. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 8: 642 - 647.

King D P, Takahashi J S, 2000. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals[J]. *Annu. Rev. Neurosci.*, 23: 713 - 742.

Konopa R J, Benzer S, 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster* [J]. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68: 2112 - 2116.

Kume K, Zylka M, Sriram S *et al*, 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop[J]. *Cell*, 98: 193 - 205.

Lee C, Parikh V, Itsukaichi T *et al*, 1996. Resetting the *Drosophila* clock by photic regulation of PER and PER-TIM complex[J]. *Science*, 271: 1740 - 1744.

McDonald M J, Rosbash M, Emery P, 2001. Wild-type circadian rhythmicity is independent on closely spaced E-boxes in the *Drosophila timeless* promoter[J]. *Mol. Cell Biol.*, 21(4): 1207 - 1217.

Myers M P, Wager-Smith K, Wesley C S *et al*, 1995. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene *timeless*[J]. *Science*, 270: 805 - 808.

Myers M, Wager-Smith K, Rothenfluh-Halfiker A *et al*, 1996. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of *Drosophila* circadian clock[J]. *Science*, 271: 1736 - 1740.

Ousley A, Zafarullah K, Chen Y F *et al*, 1998. Conserved region of the *timeless* clock gene in *Drosophila* analyzed through phylogenetic and functional studies[J]. *Genetics*, 148: 815 - 825.

Piccin A, Couchman M, Clayton J D *et al*, 2000. The clock gene *period* of the housefly, *Musca domestica*, rescue behavioural rhythmicity in *Drosophila melanogaster*: Evidence for intermolecular coevolution[J]. *Genetics*, 154: 747 - 758.

Price J L, Blau J, Rothenfluh A *et al*, 1998. Double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation [J]. *Cell*, 94: 83 - 95.

Rosato E, Treisan A, Sandrelli F *et al*, 1997. Conceptual translation of *timeless* reveals alternative initiating methionines in *Drosophila*[J]. *Nucleic Acid Res.*, 25: 455 - 457.

Rutila J E, Suri V, So V *et al*, 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timesless*[J]. *Cell*, 93: 805 - 814.

Saez L, Young M W, 1996. Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins *period* and *timesless*[J]. *Neuron*, 17: 911 - 920.

Sangoram A M, Saez L, Anotch M P *et al*, 1998. Mammalian circadian autoregulatory loop: a *timeless* ortholog and m*Per*1 interact and negatively regulate CLOCK-BAML1-induced transcription[J]. *Neuron*, 21: 1101 - 1113.

Sehgal A, Price J L, Man B *et al*, 1994. Loss of circadian behavioural rhythms and *per* RNA oscillations in the *Drosophila mutants timeless* [J]. *Science*, 263: 1603 - 1606.

Sehgal A, Rothenfluh-Halfiker A, Hunter-Ensor M *et al*, 1995. Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in *period* gene autoregulation[J]. *Science*, 270: 808 - 810.

Vossall L B, Price J L, Sehgal A *et al*, 1994. Block nuclear localization of *period* protein by a second clock mutation, *timeless*[J]. *Science*, 263: 1606 - 1609.

Wang G K, Ousley A, Darlington T K *et al*, 2001. Regulation of the cycling of *timeless* (*tim*) RNA[J]. *J. Neurobiol.*, 47(3): 161 - 175.

Wager-Smith K, Kay S A, 2000. Circadian rhythms genetics: from flies to mice to humans[J]. *Nature*, 26: 23 - 27.

Wilsbacher L D, Takahashi J S, 1998. Circadian rhythms: molecular basis of the clock[J]. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8: 595 - 602.

Zheng X Z, Zhang Y P, Zhu D L *et al*, 1998. The molecular biology of the *period* gene[J]. *Zool. Res.*, 19(6): 473 - 481. [郑向忠，张亚平，朱定良等，1998. 生物钟基因 *period* 的分子生物学. 动物学研究，19(6): 473 - 481.]

Zylka M J, Shearman L P, Levine J D *et al*, 1998. Molecular analysis of mammalian *timeless*[J]. *Neuron*, 21: 1115 - 1122.

Timeless Gene and Biological Clock Genes

LIU Zong-Min ZHANG Ya-Ping[①]

(*Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*)

Abstract: The article summarized the discovery, polymorphyism and important function of the *timeless* gene. It is one of the two firstly discoverd biological clock genes. The circadian rhythms are controlled through autoregulatory feedback loop by the products of the biological clock genes including PER, TIM, CLOCK and CYCLES. The TIM may be regulated by light and form a allodimmer with PER, and the allodimmer can drive the circadian behavioral processes of *Drosophila*. The lucubrating of the mechanism of biological clock genes will greatly be helpful to explain the human complex behaviors.

Key words: *Timeless*; Clock gene; Molecular circadian mechanism

①Corresponding author, E-mail: zhangyp@pubic.km.yn.cn